斑蝥素对草地贪夜蛾 Sf9 细胞膜完整性和膜电位的影响

汪 丽, 张来喜, 张志勇*, 杨宝东, 王进忠, 张爱环, 张民照
(北京农学院植物科学技术学院, 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要: 为明确斑蝥素对昆虫细胞膜的作用及其机理, 本研究利用草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的卵巢细胞系 Sf9 细胞作为实验材料, 采用透射电子显微技术(transmission electron microscope, TEM)、激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)结合荧光探针 FDA/PI 及 DiBAC4(3)技术研究斑蝥素(cantharidin, CTD)对 Sf9 细胞膜完整性及膜电位(membrane potential, MP)的影响。结果表明: 32 μmol/L CTD 处理 6 h 和 12 h 后, 电镜观察均未发现细胞膜结构破损; FDA/PI 染色后, 32 μmol/L CTD 处理 0.5 h 后细胞 FDA 荧光强度比对照显著降低($P<0.05$), 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色的细胞比例与对照无显著性差异($P\geqslant0.05$)。32 μmol/L CTD 处理 140 s 后即引起 MP 发生显著性去极化($P<0.05$); 64 μmol/L CTD 处理瞬时 MP 发生显著性去极化($P<0.05$); 32 μmol/L CTD 处理 3 h 内及 64 μmol/L CTD 处理 2 h 内 MP 仍保持显著性去极化($P<0.05$), 之后去极化程度降低; 32 μmol/L CTD 处理 6 h 及 64 μmol/L CTD 处理 3 h 时 MP 去极化与对照组相比已无显著性差异($P\geqslant0.05$)。结果说明, CTD 处理短时间内可引起 Sf9 细胞膜电位去极化并维持一段时间, 同时导致细胞活性发生不可逆下降, 但未对细胞膜结构完整性产生破坏。

关键词: 草地贪夜蛾; 斑蝥素; Sf9 细胞; 膜完整性; 膜电位; 去极化
中图分类号: Q965.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2013)05-0512-09

Effect of cantharidin on cell membrane integrity and potential in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells

WANG Li, ZHANG Lai-Xi, ZHANG Zhi-Yong*, YANG Bao-Dong, WANG Jin-Zhong, ZHANG Ai-Huan, ZHANG Min-Zhao (Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: To investigate the effect of cantharidin (CTD) on insect cell membrane and its mechanism, the cell membrane integrity and potential in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells treated with CTD were tested by transmission electron microscope (TEM) and laser scanning confocal microscope (LSCM) combined with fluorescent dyes FDA/PI and DiBAC4(3). The results showed that after the Sf9 cells were treated with 32 μmol/L CTD, their membrane structure was not disrupted at 6 h and 12 h after treatment, respectively. The FDA fluorescence intensities of the treated cells evidently declined compared with the control ($P<0.05$) while the proportion of the PI-staining cells was not significantly different from that of the control ($P\geqslant0.05$) at 0.5 h after treatment under TEM observations. The membrane potential (MP) in Sf9 cells was depolarized significantly both at 140 s after treatment with 32 μmol/L CTD and in the instantaneous treatment with 64 μmol/L CTD ($P<0.05$). The MP in Sf9 cells depolarized obviously within 3 h after treatment with 32 μmol/L CTD or 2 h with 64 μmol/L CTD ($P<0.05$), and then the degree of deplorization declined. At 6 h after treatment with 32 μmol/L CTD or at 3 h with 64 μmol/L CTD, MP deplorization in treated cells was not significantly different from that in the control ($P\geqslant0.05$). The results suggest that CTD causes the depolarization of cell membrane potential in Sf9 cells, which will maintain for a period of time, and induces an irreversible decline in cell activity, but not destroys the integrity of the cell membrane structure.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; cantharidin; Sf9 cells; membrane integrity; membrane potential; depolarization

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971938); 北京市高校人才强教计划项目(PHR-201107135); 国家科技支撑计划课题(2012BAD19B06)
作者简介: 汪丽, 女, 1988 年生, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向为果品优质生态安全, E-mail: xiangxiangwl@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangzy16@yahoo.com.cn
收稿日期 Received: 2013-01-06; 接受日期 Accepted: 2013-03-03

斑蝥素(cantharidin，CTD，$C_{10}H_{12}O_4$)是一种倍半萜类物质，广泛存在于鞘翅目(Coleoptera)芫菁科(Meloidae)斑芫菁属 *Mylabris* 的昆虫体内的天然产物(McCormick *et al.*，1987；Moed *et al.*，2001；Nikbakhtzadeh *et al.*，2007)，其分子量 196.2。已经被证实具有杀虫(Carrel and Eisner，1974；Frenzel *et al.*，1992；Carrel *et al.*，1993；张志勇等，1998；李晓飞等，2008；刘瑞瑞等，2010)、抑菌、除草等活性(Matsuzawa *et al.*，1987；曹微丹等，2008)。斑蝥素饲喂小菜蛾 *Plutella xylostella* 后，解剖试验发现其幼虫中肠组织发生明显的病变，杯状细胞微绒毛脱落、断裂，细胞膜性结构坏死，线粒体等细胞器结构变性，部分细胞消融；同样，粘虫 *Leucania separata* 也出现类似的结果(Carrel and Eisner，1974；张志勇等，2000)。斑蝥素触杀小菜蛾后，试虫体壁表皮层影响不大，而皮细胞线粒体内嵴发生模糊，出现空泡，表现出与胃毒中毒中肠细胞类似的超微结构破坏(陈利平等，2011)。

Sf9 细胞是鳞翅目昆虫草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢中分离而建立的离体培养昆虫 IPLB-Sf21 细胞系的克隆株，形态规则圆形且半贴壁，是深入研究活性物质作用机制的理想实验材料。国内外许多学者以 Sf9 细胞为实验试材研究活性物质的作用及机制(Cohen *et al.*，1996；Rahioui *et al.*，2007；贾建文等，2009)。本课题组前期以鳞翅目昆虫 Sf9 细胞为实验材料进行研究发现，斑蝥素处理昆虫细胞 3 h 后，出现受试细胞固缩、胞膜突出、质膜膜泡化、DNA 片段化、凋亡小体产生等细胞凋亡的显著特征，证明凋亡是供试细胞死亡的主要形式之一(陈利平等，2008；张来喜等，2011)，采用 CCK-8 毒性检测法证明低剂量(32 μmol/L)斑蝥素处理 12 h 即可产生较强的毒性作用，细胞抑制率达 50%左右(周晗颖等，2012)。

细胞膜是整个细胞保持正常生理条件的基础，膜完整性是细胞维持正常生命活动的重要保障。膜电位(MP)是细胞膜内外两侧离子的不均衡分布以及这些离子在膜两侧分布发生改变而形成的。MP 的自稳失调将导致细胞膜生物物理特性改变而影响细胞质微环境。细胞膜完整性以及 MP 是反映细胞生理活性的重要指标。细胞膜电位改变是细胞内许多生物学反应的早期事件，许多生物毒素均能诱导细胞膜电位的改变。Cecchini 等(2006)采用荧光染料 DiBAC4(3)和激光共聚焦显微镜测细胞膜电位方法，观察巴西钳蝎毒素对 C6 胶质瘤细胞膜电位的影响，发现细胞膜呈去极化改变。脱氧鬼臼毒素诱导美洲大蠊 *Periplaneta americana* 背侧不成对中间神经元膜电位发生去极化(孙芹等，2010)。虽然之前的研究在一定程度上阐述了斑蝥素对 Sf9 细胞的毒理现象，也有报道斑蝥素可诱导鼠神经细胞膜电位的去极化(Hong *et al.*，2000)，但斑蝥素对鳞翅目昆虫细胞膜完整性和膜电位的影响尚未见报道。为了阐明斑蝥素快速透过细胞膜致毒的相关机理，本实验从细胞膜电位和细胞膜完整性两方面进行了研究，旨在为探索斑蝥素对鳞翅目昆虫的毒性作用机理提供新证据。

1　材料与方法

1.1　供试细胞

Sf9 细胞由中国科学院动物研究所提供，无菌培养室内传代。培养方法同周晗颖等(2012)的方法，加入 Sf-900 Ⅱ SFM 完全培养基(89% Sf-900 Ⅱ SFM 基础培养基 +10% 胎牛血清 +1% 双抗) 3 mL/瓶，以 1∶3(v/v)进行细胞传代，置于细胞培养箱(27℃)培养。

1.2　主要仪器与试剂

1.2.1　仪器：HEPA Class100 细胞培养箱，美国 Thermo Forma 公司产品；SW-CJ-IFD 超净工作台，苏州净化设备有限公司产品；CK40-SL 倒置显微镜，日本 Olympus 公司产品；GI36D 全自动高压灭菌器，美国 Zealway 公司产品；Model 680 酶标仪，美国 BIO-RAD 公司产品；TCS SP5 激光共聚焦显微镜，德国 LEICA 公司产品。

1.2.2　试剂及试液配制：斑蝥素(CTD)(纯度 > 98%)，美国 SIGMA 公司产品；Sf-900 Ⅱ SFM 培养基、胎牛血清、双抗[链霉素和青霉素(100 ×)]，美国 GIBCO 公司产品；丙酮(分析纯)，北京蓝弋公司产品；乙酸荧光素(FDA)(纯度 > 98%)、碘化丙啶(PI)(纯度 > 97%)、特异性膜电位荧光探针 DiBAC4(3)(纯度 > 95%)，美国 SIGMA 公司产品。

斑蝥素药液配制：少量丙酮溶解，Sf-900 Ⅱ SFM 基础培养液配置成 100 μg/mL 的母液(丙酮最终含量 < 1%)，过滤灭菌后 4℃保存，临用前用 Sf-900 Ⅱ SFM 培养基稀释 CTD 母液配置成不同浓度的工作液。

染液配制：DiBAC4(3)母液参考 Wolff 等(2003)的方法配制，加入 DMSO 溶解成 10 mmol/L

-20℃储存，临用前加 Sf-900 Ⅱ SFM 基本培养基稀释为 5 μmol/L。FDA 母液参考 Kenneth 等(1985)的方法配成 5 mg/mL 丙酮溶液，-20℃储存。临用前加入 Sf-900 Ⅱ SFM 基础培养液稀释成 40 μmol/L。PI 母液配制参考 Kenneth 等(1985)的方法，用 Sf-900 Ⅱ SFM 基础培养液配成 100 μg/mL PI 储备液，置于 4℃冰箱中保存，临用前加入 Sf-900 Ⅱ SFM 基本培养基稀释成 15 μmol/L。

1.3 透射电子显微镜技术(TEM)和激光共聚焦显微技术(LSCM)检测细胞膜的完整性

1.3.1 透射电子显微镜技术(TEM)检测细胞膜的结构完整性：取对数生长期 Sf9 细胞 4 瓶，对照组加入 5 mL 基本培养基，其余 3 瓶分别加入 5 mL 32 μmol/L CTD 溶液，分别于处理 0，6 和 12 h 时终止反应，从细胞培养瓶内吹洗收集细胞于 15 mL 无菌离心管内，1 000 r/min 离心，弃上清，加入 1.5 mL pH 7.2 磷酸缓冲液混匀，转移到 1.5 mL 离心管内，1 000 r/min 离心，弃上清。参照 Bozzola (2007)的方法，加入 2.5% 的戊二醛前固定液，固定 15 min 后，用牙签挑一下固定液中的细胞看是否成团状，再放室温固定 24 h，放入 4℃冰箱再固定 1 d，经磷酸缓冲液漂洗，用锇酸固定后，再经从低到高的不同浓度的乙醇逐级脱水，最后用无水乙醇脱水后用无水丙酮置换，用包埋剂包埋，聚合，修块，切片，用重醋酸铀和柠檬酸铅双染色，电镜观察细胞膜结构的变化。

1.3.2 激光共聚焦显微技术(LSCM)结合 FDA/PI 双染检测细胞膜的完整性：实验前 1 d 将 Sf9 细胞传代至 35 mm 培养皿中，待生长至 80% 左右，弃去培养液。对照组加入不含 CTD 的基本培养基，处理组分别加入含 32 μmol/L 和 64 μmol/L CTD 的培养基，分别于 0，0.5，1，2，3 和 6 h 后终止反应。CTD 处理后弃去培养液，加入含 40 μmol/L FDA 的 Sf-900 Ⅱ SFM 基本培养基中，室温下负载 3 min；后加入 1 mL 含有 14 μmol/L PI 的基本培养基中，室温下负载 1 min (Kenneth *et al.*, 1985)，保留染料上机测定。统计 FDA 和 PI 进入 Sf9 的细胞数和荧光强度变化。检测 CTD 进入 Sf9 细胞后胞内荧光强度的变化。实验重复 5 次。

1.4 激光共聚焦显微技术(LSCM)结合 DiBAC4(3)检测 Sf9 细胞膜电位(MP)

1.4.1 斑蝥素对 Sf9 细胞 MP 瞬时动态变化的影响：待测细胞的培养方法同上。弃去培养液后，加入 5 μmol/L 特异性荧光探针 DiBAC4(3) 1 mL 于 35 mm 培养皿，于室温下避光负载 20 min (Wolff *et al.*, 2003; Cecchini *et al.*, 2006)荧光探针的负载后，保留染料，置于激光共聚焦显微镜的载物台上，对其进行连续动态扫描(激发波长 488 nm，发射波长 540 nm)，先连续扫描 1 min，测定基础荧光强度。待基线平稳后，用微量加液器加入斑蝥素溶液使其终浓度达到 32 μmol/L 和 64 μmol/L，对照组加入等体积基本培养基。每隔 20 s 扫描 1 次，检测 300 s 内细胞 MP 荧光强度(fluorescence intensity，FI)动态变化。实验设 3 次重复。

1.4.2 斑蝥素在 6 h 内对 Sf9 细胞膜电位(MP)的持续影响：细胞处理方法同上文 1.3.2 节，对照组为不含 CTD 的基本培养基，CTD 处理浓度为 32 μmol/L 和 64 μmol/L，处理时间分别为 0，1，2，3 和 6 h。CTD 处理后弃去培养液，加荧光探针 DiBAC4(3)负载 20 min 后，将样品置于激光共聚焦显微镜载物台上；倒置相差显微镜下观察并确定所要检测的细胞区域，然后进入荧光扫描程序。激发波长为 488 nm 和 540 nm；扫描方式为时间扫描，扫描密度(分辨率)为 512 × 512；扫描速度为快速扫描；调节焦平面使荧光图像清晰(马晓翠等，2003)。检测 CTD 处理 1，2，3 和 6 h 后细胞 MP FI 变化。实验设 3 次重复。

1.5 数据统计与分析

Sf9 细胞 MP 瞬时动态变化的检测采用 Leica LAS AF Lite 软件分析，随机选取 20 个细胞进行动态测量；对激光共聚焦显微检测的图像及时间进行实时测量，分析 CTD 处理 Sf9 细胞 MP 瞬时荧光强度值的变化。

CTD 在不同时间段对 Sf9 细胞 MP 和 FDA 荧光强度变化的检测采用 Leica LAS AF Lite 软件分析，随机选取 5 个以上视野的细胞，且每个视野随机至少选取 20 个细胞。分析对照组细胞的荧光值和斑蝥素处理不同时间后 Sf9 细胞的 MP 的荧光值。PI 进入细胞的比例(%)采用平方根反正弦转换后进行统计分析。所有获得数据采用 Excel 处理后，使用 SPSS 17.0 分析软件进行单因素 ANNOVA 方差分析(Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验)；实验结果以平均值 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 斑蝥素处理后 Sf9 细胞膜完整性的变化

2.1.1 TEM 检测 CTD 对细胞膜结构完整性的变

化：图 1 为透射电子显微镜观察 CTD 处理后 Sf9 细胞超微结构变化。由图 1 可知：斑蝥素处理 Sf9 细胞 0，6 和 12 h 后细胞膜结构依然完整（见图 1 箭头标示），未观察到细胞膜破损和产生孔洞等现象。显示斑蝥素处理 12 h 内未破坏细胞膜结构，Sf9 细胞膜依然具有完整性。

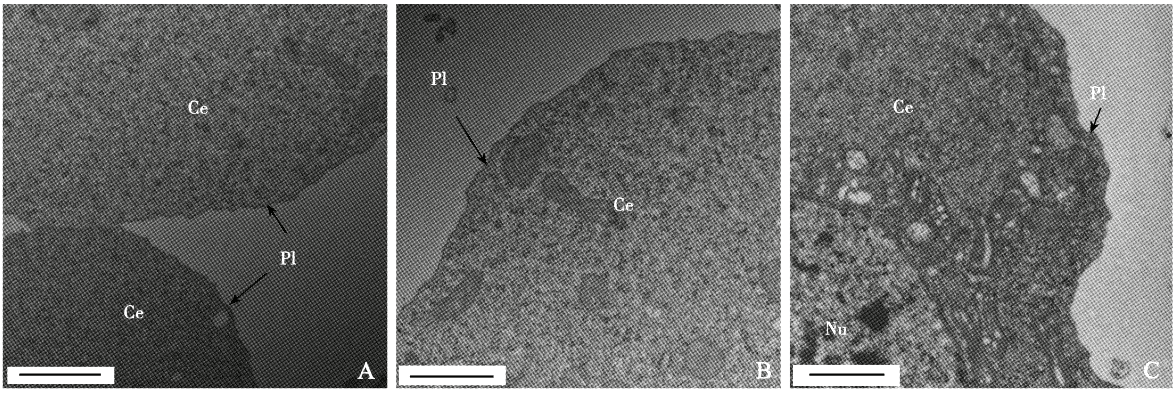

图 1　斑蝥素对 Sf9 细胞膜结构完整性的影响

Fig. 1　Effect of cantharidin on the integrity of cell membrane structure in Sf9 cells

A－C：32 μmol/L 斑蝥素分别处理 0，6 和 12 h（At 0，6 and 12 h after treatment with 32 μmol/L cantharidin，respectively）. Ce：细胞 Cell；Pl：细胞膜 Plasma membrane；Nu：细胞核 Nucleolus. 标尺 Bars = 1 μm.

2.1.2　LSCM 检测斑蝥素处理对 Sf9 细胞膜完整性的影响：二乙酸荧光素 FDA 是一种不带电荷的脂溶性分子，极易进入活细胞，其本身不发荧光，进入细胞后被细胞内的非特异性酯酶水解，释放出能发黄绿色荧光的荧光素分子，荧光强度与细胞活性呈正相关。PI 是一种能嵌入到双链 DNA 和 RNA 碱基对中发出红光的荧光探针。它不能透过完整的活细胞膜进入细胞内，但细胞膜有损伤和细胞坏死时则能够进入细胞并嵌入 DNA 和 RNA 发出桔红色荧光。这两种染料可以很好地反映细胞膜完整性和细胞活性的变化。

加入不同浓度 CTD 后 FDA 和 PI 标记的 Sf9 细胞内荧光强度随时间的变化情况见图 2。如图 2 所示，CK 组在 0.5，1，2，3 和 6 h 时间内 FDA 荧光强度无显著性差异（$P < 0.05$）。加入 32 μmol/L CTD 后 0.5 h FDA 荧光强度是对照组的 89.66%，到 6 h 后 FDA 荧光强度下降为对照组荧光强度的 21.86%。各时间段处理 FDA 荧光强度与对照组相比均有极显著差异（$P < 0.01$），加入 64 μmol/L CTD 处理后 FDA 荧光强度亦逐渐减弱，且减幅大于 32 μmol/L CTD 处理（图 3）。结果表明斑蝥素处理浓度越高、处理时间越长，对细胞的毒性作用愈强、细胞活性降低愈明显。进一步分析 CTD 处理后 PI 进入 Sf9 的细胞数（表 1）发现，虽然各处理均有极少数细胞有 PI 进入染色，但与对照组相比无显著差异（$P \geq 0.05$），表明实验中各处理包括 CK 的个别细胞 PI 染色系操作损伤后所致。综上所述，CTD 处理 Sf9 细胞在测试时间 0～6 h 内可导致细胞活性下降，且活性降低呈不可逆趋势。但并未破坏细胞膜的完整性。

2.2　斑蝥素处理对 Sf9 细胞膜电位的影响

2.2.1　斑蝥素对 Sf9 细胞 MP 瞬时动态变化的影响：DiBAC4（3）荧光探针是一种细胞膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料，本身无荧光，当进入细胞与胞浆内的蛋白质结合后才发出荧光。荧光强度增加，即膜电位增加表示细胞去极化；反之，细胞内荧光强度降低即膜电位降低，表示细胞超极化。斑蝥素对 Sf9 细胞 MP 瞬时动态变化见图 4。64 μmol/L CTD 瞬时加入后，MP FI 由 168.94 ± 0.50 升高到 180.12 ± 4.99，与对照组相比有显著性差异（$P < 0.05$），且在检测 220 s 内仍保持差异。32 μmol/L CTD 瞬时加入后 MP FI 亦略有升高，且在处理 140 s 后到检测结束过程中 MP FI 与对照相比有显著性差异（$P < 0.05$）。表明在 CTD 处理 Sf9 瞬时细胞膜电位出现去极化现象，且较高浓度（64 μmol/L）CTD 处理瞬时 MP 发生显著性去极化，32 μmol/L CTD 处理 140 s MP 产生显著性去极化。

2.2.2　斑蝥素对 Sf9 细胞膜电位（MP）的持续影响：CTD 处理不同时间段内细胞膜电位荧光强度变化如图 5 所示，对照组在不同时间内膜电位荧光强度无显著性变化，32 μmol/L CTD 处理 1～3 h 后细胞膜电位荧光强度明显增强，6 h 荧光强度稍减弱；

μmol/L CTD 处理 1 h 和 2 h 后 Sf9 细胞 MP FI 与对照组相比分别增加了 18.27% 和 24.20%，相对于对照组均有显著性差异（$P<0.05$），MP FI 3 h 后回落，分别为对照组荧光强度 110.63% 和 106.82%，但与对照组均无显著性差异（$P\geq0.05$）。结果表明，CTD 处理后短时间内，细胞膜电位上升出现较强烈去极化现象，持续一段时间后，随即膜电位开始下降，逐渐复极化，此时细胞内荧光开始呈现不规则明暗变化，表明细胞活性已经开始受到抑制。

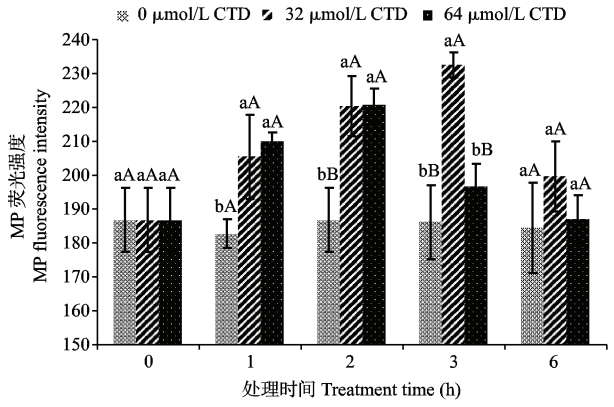

图 6 斑蝥素对 Sf9 细胞 MP 持续作用的影响

Fig. 6 Effect of CTD on cell membrane potential of Sf9 cells

3 讨论

本课题组前期实验研究证明低剂量（32 μmol/L）斑蝥素处理 Sf9 细胞 12 h 即可产生较强的毒性作用（周晗颖等，2012），并且导致细胞凋亡（陈利平等，2008；张来喜等，2011），本实验表明，在同样低剂量处理 0.5 h 后，Sf9 细胞活性即显著下降，且处理时间增加，活性愈显著下降，提示 CTD 对供试细胞的致毒作用比较迅速，且随时间增加致毒作用愈明显。该剂量处理 12 h 内，电镜结果显示细胞膜结构完整，且处理 6 h 内大分子 PI 鲜有进入细胞，表明斑蝥素处理一段时间未破坏细胞膜的完整性。

细胞膜电位是由于某些离子如 K^+、Na^+ 等在细胞膜两侧的不均衡分布，以及这些离子在膜两侧分布发生了改变而形成的，即细胞膜电位与膜通透性（尤其离子通透性）直接相关。本实验研究证明斑蝥素在处理短时间内 Sf9 细胞膜电位即发生显著性去极化，且在一段时间内保持显著性去极化。提示这种致毒是 CTD 暴露短时间内即开始的。说明 CTD 对供试细胞的毒性与细胞膜透性改变直接相关。

正常状态下，细胞膜上的离子转运系统（包括离子通道、载体蛋白和离子泵）使细胞膜内外保持着一定的不均衡离子分布，形成内负外正的膜电位，这种电位梯度对多种离子的跨膜流动是必需的。其中离子通道是能选择性地允许离子进出细胞的细胞膜孔道。膜电位既取决于离子通道的状态，又取决于胞质与胞外介质中离子的浓度。当细胞受外界刺激时且当外界刺激强度达到一定阈值时，细胞膜对离子的通透性会发生突然变化，最后使膜电位发生改变。与大范围的离子浓度相比，质膜的电位变化发生得迅速，在短时间内——几秒或几分钟后，控制膜电位方面最重要的是离子通道（Bruce *et al.*, 2009）。有报道许多生物毒素诱导细胞膜电位变化和离子通道状态的变化有关（Cecchini *et al.*, 2006；李静等，2008；孙芹等，2010）。本实验结果显示 32 μmol/L CTD 处理 140 s 时引起细胞膜电位变化，64 μmol/L CTD 处理瞬时即引起细胞膜电位显著去极化，表明斑蝥素对细胞膜电位变化的影响与离子通道有关。但具体何种离子通道参与还需进一步研究。

激光共聚焦显微镜和特异性荧光探针 DiBAC4(3)技术能够很好地反映药物对细胞膜电位的影响（Loew *et al.*, 1993；Yamda *et al.*, 2001；Wolff *et al.*, 2003），但是不能反映膜电位的变化是何种离子透性变化所引起的。虽然有报道斑蝥素进入小鼠细胞后抑制胞内 Ca^{2+} 释放（Hong *et al.*, 2000），改变了细胞膜内外离子浓度的平衡状态，因而导致了膜电位的改变。但斑蝥素对细胞膜电位变化的影响是否与 Ca^{2+} 有关以及是否还有其他离子参与等还有待进一步研究。

致谢 中国科学院动物研究所秦启联、张寰老师惠赠供试细胞，农业应用新技术北京市重点实验室房克凤和胡海文老师给予激光共聚焦实验仪器的指导，北京农学院生物技术学院孙清鹏老师给予实验指导，特此致谢。

参考文献（References）

Bozzola JJ, 2007. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells. *Electron Microscopy Methods in Molecular Biology*, 369: 1 – 18.

Bruce A, Dennis B, Karen H, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W, 2009. Essential Cell Biology. Garland Publishing Inc., New York. 390 – 409.

Cao WD, Zhang ZY, Yang BD, Zhang MZ, Sun SL, 2008. Inhibition of cantharidin and demethylcantharidin to seven phytopathogenic fungi.

Acta Phytophylacica Sinica, 35(1): 63 - 68. [曹微丹, 张志勇, 杨宝东, 张民照, 孙淑玲, 2008. 斑蝥素及去甲斑蝥素对七种植物病原真菌的抑制作用. 植物保护学报, 35(1): 63 - 68]

Carrel JE, Eisner T, 1974. Cantharidin, potent feeding deterrent to insects. *Science*, 183: 755 - 757.

Carrel JE, McCairel MH, Slagle AJ, Doom JP, Brill J, McCormick JP, 1993. Cantharidin production in a blister beetle. *Experientia*, 49 (2): 171 - 174.

Cecchini AL, Vasconeelos F, Amara SG, Giglio JR, Arantes EC, 2006. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its toxin TsTX-V on neurotransmitter uptake in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217: 196 - 203.

Chen LP, Yang BD, Zhang ZY, Wang JZ, Sun SL, 2008. Effects of cantharidin on insect cell Spex-Ⅶ and Sf9. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 23(4): 17 - 20. [陈利平, 杨宝东, 张志勇, 王进忠, 孙淑玲, 2008. 斑蝥素对昆虫细胞 Spex-Ⅶ和 Sf9 的作用效果. 北京农学院学报, 23(4): 17 - 20]

Chen LP, Yang BD, Zhang ZY, Zhang AH, Zhang MZ, Zhang LY, Sun SL, 2011. Effect of cantharidin on the integument structure of *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 252 - 258. [陈利平, 杨宝东, 张志勇, 张爱环, 张民照, 张来喜, 孙淑玲, 2011. 斑蝥素对小菜蛾体壁组织结构的影响. 应用昆虫学报, 48(6): 252 - 258]

Cohen E, Quistad GB, Casida JE, 1996. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sciences*, 58(13): 1075 - 1081.

Frenzel M, Dettner K, Wirth D, Waibel J, Boland W, 1992. Cantharidin analogues and their attractancy for ceratopogonid flies (Diptera: Ceratopogonidae). *Experiential.*, 48(1): 106 - 111.

Hong S, 2000. Inhibition of mouse neuromuscular transmission and contractile function by okadaic acid and cantharidin. *British Journal of Pharmacology*, 130: 1211 - 1218.

Jia JW, Huang JF, Wang WX, Hu MY, Zhong GH, 2009. Effects of different insecticidal components on induction of apoptosis in *Spodoptera frugiperda* cultured cell line Sf9. *Journal of South China Agricultural University*, 30(4): 29 - 35. [贾建文, 黄劲飞, 王文祥, 胡美英, 钟国华, 2009. 不同杀虫成分对 Sf9 细胞凋亡的影响. 华南农业大学学报, 30(4): 29 - 35]

Kenneth H, Jone S , Jame SA, Senf T, 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(1): 77 - 79.

Li J, Wang XJ, Cheng J, Gao R, Xiao H, Qian YN, 2008. Effect of scorpion polypeptide from *Buthus martensi* Karsch venom on membrane potential of PC12 cells and its correlation with sodium channel. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing* (*Natural Science*), 28(4): 480 - 483. [李静, 汪溪洁, 程洁, 高蓉, 肖杭, 钱燕宁, 2008. 东亚钳蝎毒素多肽对 PC12 细胞膜电位的影响及其与钠通道的关系. 南京医科大学学报(自然科学版), 28(4): 480 - 483]

Li XF, Chen XS, Hou XH, 2008. Biodegradation of cantharidin by parasitic fungus of Meloidae. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45 (4): 608 - 610. [李晓飞, 陈祥盛, 侯晓晖, 2008. 芫菁寄生菌降解斑蝥素. 昆虫知识, 45(4): 608 - 610]

Liu RR, Ma Y, Ma ZQ, Zhang YL, 2010. Bioactivity of cantharidin against eleven pests. *Journal of Northwest A&F University* (*Natural Science Edition*), 38(11): 181 - 185. [刘瑞瑞, 马燕, 马志卿, 张雅林, 2010. 斑蝥素对 11 种害虫的杀虫活性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 38(11): 181 - 185]

Loew LM, Campagnola P, Lewis A, Wuskell JP, 2002. Confocal and nonlinear optical imaging of potentiometric dyes. *Methods in Cell Biology*, 70: 429 - 449.

Ma XC, Sha YL, Lin KC, Nie SQ, 2003. Effects of Aβ1-40 on cell membrane permeability and intracellular free calcium in neural cells. *Chinese Science Bulletin*, 48(8): 802 - 806. [马晓翠, 沙印林, 林克椿, 聂松青, 2003. Aβ1-40 对神经细胞膜通透性及胞内游离 Ca^{2+} 的影响. 科学通报, 48(8): 802 - 806]

Matsuzawa M, Grazian MJ, Caside JE, 1987. Endothall and cantharidin analogues: relation of structure to herbicidal activity and mammalian toxicity. *J. Agric. Food Chem.*, 35(5): 823 - 829.

McCormick JP, Carrel JE, 1987. Cantharidin biosynthesis and function in meloid beetles. In: Prestwich GD, Blomguist GJ eds. Pheromone Biochemistry. Academic, New York. 307 - 350.

Moed L, Shwayder TA, Chang MW, 2001. Cantharidin revisited: a bilstering defense of an ancient medicine. *Arch. Dermatol.*, 137 (10): 1357 - 1360.

Nikbakhtzadeh MR, Ebrahimi B, 2007. Detection of cantharidin-related compounds in *Mylabris impressa* (Coleoptera : Meloidae). *Journal of Venomous Animals & Toxins*, 13(3): 686 - 693.

Plasek J, Hronda V, 1991. Assessment of membrane potential changes using the carbocyanine dye, DiBAC4(3): synchronous excitation spectroscopy studies. *Eur. Biophys. J.*, 19(4): 183 - 188.

Rahioui I, Laugier C, Balmand S, Da Silva P, Rahbe Y, Gressent F, 2007. Toxicity, binding and internalization of the pea-A1b entomotoxin in Sf9 cells. *Biochimie*, 89(12): 1539 - 1543.

Sun Q, Xu P, Wang LS, Hu F, Cheng J, Xiao H, Gao R, 2010. Effect of deoxypodophyllotoxin on membrane potential of dorsal unpaired median neurons and its relationship with sodium channel. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 28(10): 740 - 743. [孙芹, 许鹏, 王立山, 胡凡, 程洁, 肖杭, 高蓉, 2010. 脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊背侧不成对中间神经元膜电位的影响及其与钠通道的关系. 中华劳动卫生职业病杂志, 28 (10): 740 - 743]

Wolff C, Fuks B, Chatelain P, 2003. Comparative study of membrane potential sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays. *J. Biomol. Screen*, 8: 533 - 543.

Yamda A, Gaja N, Ohya S, Muraki K, Narita H, Ohwada T, Imaizumi Y, 2001. Usefulness and limitation of DiBAC4(3), a voltage sensitive fluorescent dye for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca^{2+} active K^+ channel in HEK93 cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, 86(3): 342 - 350.

Zhang LX, Yang BD, Zhang MZ, Wang JZ, Zhang AH, Zhang ZY, 2011. Critical condition of apoptosis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells lead by cantharidin. *Journal of Beijing University of*

Agriculture, 24(2): 14 – 17. [张来喜, 杨宝东, 张民照, 王进忠, 张爱环, 张志勇, 2011. 斑蝥素诱导草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)卵巢细胞系 Sf9 凋亡的临界条件. 北京农学院学报, 24(2): 14 – 17]

Zhang YL, Zhou Y, Zhang ZY, 2003. Effect of cantharidin on the midgut of the orient armyworm (*Mythimna separata*) and diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Acta Entomologica Sinica*, 46(3): 272 – 276. [张雅林, 周越, 张志勇, 2003. 斑蝥素对粘虫和小菜蛾幼虫中肠组织的影响. 昆虫学报, 46 (3): 272 – 276]

Zhang ZY, Yuan F, Zhang X, 2000. Effect of cantharidin on the digestive enzymes and esterases of diamondback moth larva. *Acta Phytophylacica Sinca*, 27(4): 355 – 358. [张志勇, 袁峰, 张兴, 2000. 斑蝥素对菜蛾消化酶及酯酶的影响. 植物保护学报, 27 (4): 355 – 358]

Zhang ZY, Yuan F, Zhang X, Li CH, 1998. The insecticidal function of cantharidin to the larvae of diamondback moth. *Acta Phytophylacica Sinica*, 25(2): 166 – 170. [张志勇, 袁峰, 张兴, 李朝红, 1998. 斑蝥素对菜蛾幼虫的毒杀作用研究初报. 植物保护学报, 25(2): 166 – 170]

Zhao Q, Zhao KS, 2006. Effect of Bay K8644 on arteriole smooth muscle cell membrane potential in rats with severe hemorrhagic shock. *J. South. Med. Univ.*, 26(4): 421 – 424. [赵清, 赵克森, 2006. 钙通道激动剂 Bayk8644 对重症失血性休克大鼠细动脉平滑肌细胞膜电位的作用. 南方医科大学学报, 26(4): 421 – 424]

Zhou HY, Yang BD, Zhang MZ, Wang JZ, Zhang AH, Zhang ZY, 2012. Comparisons of cantharidin and norcantharidin inhibitory effects on Sf9 cells. *Journal of Environmental Entomology*, 34(2): 154 – 160. [周晗颖, 杨宝东, 张民照, 王进忠, 张爱环, 张志勇, 2012. 斑蝥素与去甲斑蝥素对昆虫细胞 Sf9 抑制作用比较. 环境昆虫学报, 34(2): 154 – 160]

(责任编辑: 赵利辉)